

Evaluarea modificarilor survenite la nivelul ADN genomic și extragenomic

efectuat în cadrul proiectului *Abordarea bioeconomică a
agenților antimicrobieni – utilizare și rezistență*

(cod - PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0361).

Colectiv de redacție:

Coordonator: Prof. dr. Carmen Panaitescu

Membri: Prof. dr. Gabriela Tanasie, Conf. Dr. Carmen Tatu, doctorand Alina Simina,
Dr. Brzoska Hortensja, Conf. dr. Călin Mircu.

Data finalizării: 21.11.2019.

Acknowledgements

Activities under this work were carried out in the *Research Laboratory Complex "Horia Cernescu"* - financed by project *"A bio-economical approach of the antimicrobial agents - use and resistance"*, in the frame of contract PCCDI 7/19.03.2018, code: PN-III P1-1.2-FPRD-2017.

1. Introducere

Rezistența la antibiotice este capacitatea naturală sau dobândită a unui microorganism de a rezista efectelor unuia sau mai multor antibiotice. Numeroși cercetători au studiat acest fenomen la diferite microorganisme de-a lungul timpului.

Agenții patogeni (de bază sau izolați în cadrul studiilor clinice) care dezvoltă un fenotip de rezistență la medicamentul studiat în timpul tratamentului pot fi cercetate pentru a determina mecanismele de rezistență (Mendes et al., 2018).

Rezistența microbiană absolută apare atunci când un microorganism este rezistent *in vitro*, antibioticul folosit dovedindu-se incapabil să îi oprească multiplicarea sau când oprirea multiplicării este realizată numai de concentrații foarte mari de antibiotice, care *in vivo* ar impune doze toxice, practic inutilizabile la pacient.

Din punct de vedere microbiologic, organisme rezistente sunt acelea care posedă orice tip de mecanism al rezistenței sau gene ale rezistenței. Concentrația minimă inhibitorie (CMI) a unui antibiotic dă informații cantitative despre susceptibilitatea bacteriană. De obicei, un organism este considerat sensibil atunci când CMI este mai mic decât limita indicată de diversele laboratoare abilitate pentru astfel de standarde (Sockett et al., 2006).

Escherichia Coli – modificări survenite la nivelul ADN

În cazul *Escherichia coli* (*E. coli*) primele date legate de rezistența acesteia la tetraciclină prin mecanismul de eflux activ (eliminarea antibioticului din celulă) a fost detectat în 1970 (Levy and McMurry, 1974, McMurry et al., 1980). Multirezistența la antibiotice a *E. coli* este evidențiată prin existența genelor care codifică o enzimă de modificare a aminoglicozidelor, un determinant al rezistenței la chinolone și o enzimă ESBL (extended-spectrum beta-lactamases) pe aceeași plasmidă de rezistență (Ode et al., 2009, Robicsek et al., 2006). Enzimele ESBL aparținând familiei CTX-M sunt într-un număr crescut în *E. coli* (Lewis et al., 2007, Patterson et al., 2003, Livermore et al., 2007). Carbapenemazele de clasă B de tip VIM, IMP și NDM sunt din ce în ce mai raportate la *E. coli* (Feng et al., 2015, Ode et al., 2009, Scoulica et al., 2004, Miriagou et al., 2003, Nordmann, 2012, Hornsey et al., 2011).

Tipurile de plasmide asociate cu *E. coli* producătoare de ESBL includ IncFII, IncN și IncI1, printre care plasmidele cu rezistență IncI1 sunt cunoscute pentru a contribui la diseminarea ESBL de tip CTX-M în *E. coli* (Carattoli, 2013)

Mecanismul de rezistență al *E. coli* la β -lactame se datorează esențial transmiterii plasmidiale a genelor care codifică β -lactamazele. Între timp, multe studii recente au subliniat că proporția relativă de secvență de tip 131 *E. coli* (*E. coli* ST131) este

Evaluarea modificărilor survenite la nivelul ADN genomic și extragenomic

predominantă în toate ESB� producând *E. coli* (Banarjee și colab., 2013; Gibreel și colab, 2012) și au arătat că CTX-M-15 a fost codat în plasmide și a fost transferat pe orizontală. Când s-au comparat cercetările asupra izolatelor ST131 *E. coli* care nu produc ESB� și fluorochinolonă cu un alt studiu în care ST131 *E. coli* produce CTX-M-15 beta-lactamază și era rezistent la fluorochinolona, se pare că CTX-M-15 poate fi o β -lactamază care este dobândită din plasmide în *E. coli* rezistent la fluorochinolonă.

Screeningul diferitelor baze de date (biblioteci, libraries) pentru sensibilitatea la antibiotice a identificat posibile combinații noi de medicamente în care un agent poate inhiba un mecanism de rezistență intrinsecă și astfel crește spectrul de activitate al altor antibiotice dincolo de speciile țintă normale (Blair și colab., 2015).

Staphylococcus aureus – modificari survenite la nivelul ADN

Un mecanism de rezistență la antibiotice este modificarea țintei, a locului de legare a antibioticului. Rezistența la meticilină a tulpinilor de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) a fost observată pentru prima oară în anul 1960, această rezistență dobândindu-se prin mecanismul de înlocuire a moleculei de interes (Chambers, 1988). Tulpinile de *Staphylococcus aureus* rezistente la meticilină produc PBP 2a, o enzimă omoloagă activă cu un grad de afinitate scăzut la antibioticele beta-lactamice. PBP 2a este codificată pe locus-ul *mec*, un pachet de gene care se găsește doar în *Staphylococcus aureus* (Wu și colab., 1996).

Principala țintă de inhibare pentru antibiotice β -lactamice în *S. aureus* este transglicolilază-transpeptidaza bifuncțională PBP2 (Giesbrecht et al. 1998; Walsh 2016). Domeniul transglicozilazei din enzimă este responsabil de transferul blocului de construcție a pentapeptidei dizaharidă de peptidoglican de la lipida II legată de membrană către lanțurile polizaharidice în creștere, în timp ce domeniul transpeptidazei (TP) face legătura între puntea transversală a glicinei a celei de-a patra D-alanine a unor lanțuri adiacente.

β -lactamaza *Staphylococcus aureus* responsabilă de rezistența la penicilină este o serină β lactamază tipică (*blaZ*) care formează același tip de acil-enzimă intermediară ca TP al PBP2 (Massova și Mobashery 1998; Lowy 2003). Diferența catalitică dintre *BlaZ* și TP este data de cinetica deacilării. Cu *BlaZ*, adăugarea de apă este rapidă rezultând regenerarea situsurilor active al serinei și eliberarea acidului penicilloic deschis inelar, un produs de degradare hidrolitică fără activitate inhibitoare. Gena *blaZ* structurală este purtată de elementele de tip transpozon Tn552 sau Tn552 (Jensen și Lyon 2009). Transpozonul este fie localizat pe o plasmidă mare, al cărui prototip este pI524, fie este integrat în cromozomul bacterian. Expresia enzimei este inductibilă, fiind controlată de represorul *BlaI* și senzorul *BlaR* (Lowy 2003). Enzima în sine este o lipoproteină care este parțial localizată pe fața exterioară a membranei citoplasmatică unde este localizată strategic pentru a proteja PBP2s, în timp ce unele sunt eliberate în mediul înconjurător (Nielsen, Caulfield și Lampen 1981).

Baza rezistenței la meticilină și oxacilină (Fisher și Mobashery 2016) este achiziția unei gene care codifică un omolog al PBP2 numit PBP2a (Peacock și Paterson 2015) sau PBP2 (Utsui și Yokota 1985) care nu este susceptibilă la acțiunea antibioticului. Acest fenomen

Evaluarea modificărilor survenite la nivelul ADN genomic și extragenomic

apare pentru că serina activă al TP al PBP2a este localizată într-o porțiune care nu este accesibilă β -lactamelor (Lim și Strynadka 2002). Prin urmare, enzima poate prelua biosinteza PG dacă PBP2 TP este inactivat. De fapt, activitatea transglicozilazei PBP2 este necesară pentru biosinteza peptidoglicanului, deoarece fragmentul PBP2a nu este funcțional. Astfel, biosinteza PG este un efort de cooperare al celor două proteine atunci când TP al PBP2 este inactivat.

Atunci când o tulpină MRSA este crescută în prezența β -lactamelor, legătura încrucișată din poligalacturonază este una slabă. Una dintre consecințele acestui fapt este că peptidoglicanul are efecte proinflamatorii mai puternice care ar putea contribui la patologia în timpul infecției dacă tulpina MRSA este expusă la β -lactamele. Structura poligalacturonazei modificată ar putea, de asemenea, să explice incapacitatea de a fi indus de regulatorul global de gene accesoriu (Agr) în unele tulpini de MRSA (Rhoads, 2018).

Evaluarea genelor de rezistență și a altor modificări survenite la nivelul ADN

Pe parcursul anilor studiile de monitorizare s-au bazat pe aplicarea PCR multiplex sau singleplex în screeningul genelor de rezistență și virulente (Marshall et al., 1998; Nelson et al., 2016; Limbago et al., 2009; Mendes et al., 2007; Mendes et al., 2009). Datorită apariției metodei de secvențiere a ADN-ului de „prima generație” (secvențiere Sanger), secvențierea ampliconilor PCR a fost încorporată ca un pas suplimentar după testele PCR pentru a confirma și identificarea genelor (Deshpande et al., 2006; Pfaller et al., 2001). Relația de cauzalitate dintre prezența oricărei gene (gene) și fenotipul respectiv a fost evidențiată în cazurile genelor β lactamazei, genele de rezistență la vancomicină (de exemplu, vanA), macrolidă-lincosamidă-streptogramină B (MLS_B), fluorochinolone (gene și mutații dobândite în regiunea determinantă a rezistenței la chinolone [QRDR]), pleuromutiline, oxazolidinonele și tetraciclină (Düzgün et al., 2019).

Caracterizarea moleculară a izolatelor prelevate în cadrul studiilor clinice a fost realizată pentru a determina prezența genelor de rezistență, virulente (Mendes et al., 2010, 2012, 2015, 2017, 2018; Campbell et al., 2008; Harris et al., 2018). Tipizarea moleculară este o metodă utilizată pentru a identifica linia sau fondul genetic al tulpinilor, recuperate de la pacienții internați. Mendes și colab. au raportat rezultate în urma utilizării secvențializării de ultimă generație NGS și a instrumentelor bioinformatiche pentru screeningul genelor β -lactamază în *E. coli* la pacienții internați în Statele Unite ale Americii în timpul Programului de Monitorizare Antimicrobian SENTRY din anul 2016.

Studii recente au dus la identificarea multor gene care sunt responsabile pentru rezistența intrinsecă la antibiotice din diferite clase, inclusiv β -lactamele, β - și aminoglicozidele, fluorochinolone, acest lucru fiind obținut prin folosirea unui screening cu un randament ridicat al bibliotecilor de gene care au fost create prin inserare țintită sau o mutageneză aleatorie a transposonului în bacterii precum *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* și *Pseudomonas aeruginosa* (Liu și colab., 2010; Blake și colab., 2013). Studiul efectuat de către Rhoads și colab., în 2018 a demonstrat empiric că prezicerea susceptibilității și rezistenței folosind o secvențiere a genomului cu un randament ridicat și analiza datelor bioinformatiche poate fi posibil realizabilă pentru *Staphylococcus aureus*. În tulpinile prototipului MRSA, gena *mecA* este exprimată numai după inducerea prin expunerea la

Evaluarea modificărilor survenite la nivelul ADN genomic și extragenomic

medicament. Acesta este sub controlul proteinelor reglatoare MecIR care sunt omoloage cu proteinele BlaIR care reglează expresia BlaZ (Peacock and Paterson 2015; Fisher and Mobashery 2016). Gena mecA este indusă ineficient în urma expunerii la antibiotice β -lactam (Jensen și Lyon 2009). În multe tulpini MRSA, genele mecIR au fost trunchiate prin secvențe de inserție care, în principiu, ar trebui să conducă la expresia mecA. Cu toate acestea, regulatorii β -lactamazei BlaI și BlaR pot reprima, de asemenea, expresia mecA. Astfel, natura expresiei PBP2a poate varia de la tulpină la tulpină privind prezența regulatorilor funcționali Mec și Bla. Structura PG în MRSA poate varia în funcție de expunerea tulpinilor la antibiotice sau dacă tulpinile au ambii regulatori intacti.

2. Izolarea ADN bacterian prin diferite metode și tehnici de lucru

2.1. Izolare ADN prin tehnici chimice și enzimatic

Acest tip de metode prezintă avantajul că sunt metode simple, nu necesită aparatură complexă sau manopere complicate. Dezavantajul este reprezentat de faptul că nu se reușește izolarea unor cantități prea mari de ADN și există uneori o contaminare a produsului final cu proteine sau alte substanțe.

1. Tehnica de separare a ADN prin precipitare asociată cu digestia proteinelor cu proteinaza K.

Am utilizat ca material de lucru fie cultura bacteriană ca tare fie a fost plasat un inocul din cultura bacteriană în mediu de cultură lichid tip LB, iar recipientul a fost plasat în incubatorul cu agitare la 37 grade Celsius, timp de 24 de ore.



Fig. 1. Aspectul recipientelor de cultură cu mediu LB. Preparația mediului (stânga) și plasarea recipientelor peste noapte la incubatorul cu agitare (dreapta)

Metoda de izolare (Vassu et. Al. 2001) prevede parcurgerea următoarelor etape:

- Cultura bacteriană se centrifughează 30 min la 1200 rpm

Evaluarea modificărilor survenite la nivelul ADN genomic si extragenomic

- Sedimentul celular se resuspendă în soluție care conține TEG + lizozim = Tris 25 mM, EDTA 10 mM, glucoză 50 mM pH 8.2-8.7 567 μ l TEG + lizozim 10 – 30 mg/ml; probele se țin 15 min la 37 grade Celsius
- Se adaugă 30 μ l soluție SDS 10% și se inversează tuburile de câteva ori (în această etapă se produce liza celulară, deci, suspensia opacă devine o soluție translucidă și vascoasă);
- Pentru deproteinizare enzimatică, in fiecare tub se adaugă 5 μ l soluție stoc de proteinază K (20 mg/ml) și se incubează 1h la 37 grade Celsius
- Se realizează deproteinizare cu solvenți organici, in trei etape: cu amestec cloroform/ alcool izoamilic; cu fenol; cu amestec cloroform/ alcool izoamilic
- Urmează precipitarea acizilor nucleici cu isopropanol; precipitatul este sedimentat prin centrifugare.
- Sedimentul ADN se resuspendă în tampon TE pH 8.0. 8.

2. Tehnica de separare a ADN cu kit QIAmp DNA si purificare cu kit Pure Genomic DNA

Pentru eficientizarea procesului am decis separarea ADN bacterian pe aceleași principii, dar utilizând un kit de izolare „QIAmp DNA” (Quiagene) cu scopul de a purifica ADN-ul și de a utiliza probele rezultate în cadrul pașilor următori ai secvențierii.

Mini kit-ul „Pure Genomic DNA” specific pentru purificarea ADN-ului necesită inițial prepararea celular, iar ulterior urmărirea celor trei etape care conduc la purificare: legarea ADN, spălarea și eluarea acestuia.

În primă fază, se centrifughează suspensia celulară la viteză maximă pentru o perioadă de 3 minute, la temperatura camerei, țesutul sedimentând. Supernatantul este extras fără a atinge sedimentul. Următorul pas necesită repetare și implică adăugarea unui mL etanol 96-100%, vortexare, centrifugare la viteză maximă, 3 minute, la temperatura camerei și ulterior, îndepărtarea supernatantului, cu păstrarea sedimentului. Etanolul rezidual urmează a fi evaporat prin incubare la temperatura de 37⁰C, 5-10 minute. Se adaugă 180 μ L PureLink Genomic Digestion Buffer și 20 μ L proteinază K și se vortexează. Pasul următor implică incubarea probelor pentru o perioadă de 3 ore sau peste noapte la o temperatură de 50⁰C. După perioada de incubare se centrifughează la viteză maximă timp de 3 minute la temperatura camerei. Se adaugă 20 μ L RNase A, iar după vortexare și incubare la temperatura camerei 2 minute, se adaugă 200 μ L Pure Link Genomic Lysis/Binding Buffer. Se adaugă 200 μ L 96-100% etanol care necesită vortexare, formându-se o soluție omogenă.

Etapă care urmărește legarea ADN-ului de coloane necesită utilizarea unei coloane tip „spin” pentru fiecare probă și un nou container în care se va transfera soluția lizată (aproximativ 640 μ L). Se centrifughează la 10,000 x g, 1 minut, la temperatura camerei.

Evaluarea modificărilor survenite la nivelul ADN genomic și extragenomic

Ulterior, se urmăresc pașii etapei de spălare. Se adaugă 500 μ L Wash Buffer 1 și se centrifughează la 10,000 x g, 1 minut, la temperatura camerei. Se aruncă containerul și coloana se păstrează, utilizându-se 500 μ L Wash Buffer 2 într-un nou container, care de asemenea, se va centrifuga la viteză maximă, 3 minute, la temperatura camerei.

Etapă de eluare urmărește adăugarea de 100 μ L (25-200 μ L) PureLink Genomic Elution Buffer coloanei. Se incubează 1 minut la temperatura camerei, apoi se centrifughează coloana la viteză maximă, 1 minut, la temperatura camerei. Tubul va conține ADN purificat, iar coloana se aruncă. Stocarea pentru o perioadă mai lungă de timp se indică la o temperatură de -20°C , iar pentru utilizarea imediată se recomandă temperatura de 4°C .

Procedura purificării ADN-ului cu ajutorul mini kit-ului „QIAamp DNA”, prin intermediul microcentrifugării, implică pipetarea de 20 μ L proteinază K (sau protează QIAGEN) și 200 μ L probă de sânge într-un recipient steril. Pentru obținerea ADN-ului lipsit de ARN se adaugă 4 μ L RNase A. În următoarea etapă, se adaugă 200 μ L Buffer AL și se vortexează 15 secunde (liza eficientă se obține în momentul în care soluția devine omogenă). Este necesară incubarea probelor la o temperatură de 56°C , 10 minute, apoi se centrifughează.

Ulterior, se adaugă 200 μ L etanol (96-100%), se vortexează 15 secunde și se centrifughează. Soluția obținută se transferă într-un recipient tip coloană QIAamp Mini spin și se centrifughează la 6,000 x g (80,000 rpm), 1 minut. Filtratul obținut se aruncă, iar coloanei i se adaugă 500 μ L Buffer AW1. După centrifugare la 6,000 x g (8,000 rpm), 1 minut, se plasează coloana într-un nou recipient. Se adaugă 500 μ L Buffer AW2, se centrifughează la viteză maximă (20,000 x g; 14,000 rpm), 3 minute. Coloana se păstrează într-un nou recipient (1,5 ml) și se adaugă 100 μ L Buffer AE sau apă distilată. După incubare la temperatura camerei ($15-25^{\circ}\text{C}$), aproximativ 1 minut, se centrifughează la 6,000 x g (8,000 rpm).

2.2. Izolare ADN prin tehnici automate

În laboratorul nostru am încercat și izolarea ADN cu ajutorul extractorului automat de acizi nucleici MagNA Pure LC.

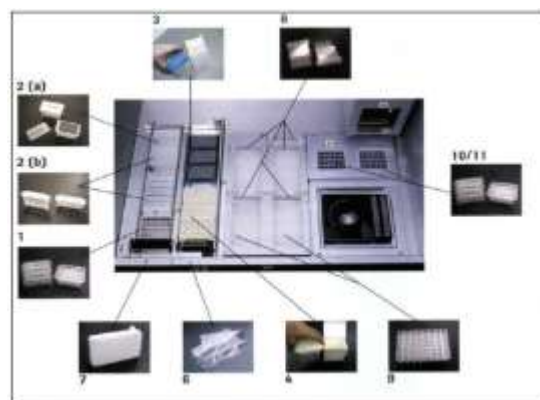


Fig. 2 Imaginea aparatului MagNA Pure LC și accesoriile de lucru

Principiul izolării ADN Procedura de izolare a ADN este bazată pe tehnologia de particule magnetice care sunt conținute în kit. Acizii nucleici sunt legați de suprafața particulelor magnetice (MGPs) prin următorul mecanism: bilele magnetice au o suprafață de sticlă și un miez magnetic. Acizii nucleici sunt adsorbiți pe suprafața de sticlă a particulelor magnetice în prezența isopropanolului și a unei sări chaotrope înalt concentrate, care transferă apă din particulele hidratate în soluție. Polizaharidele și proteinele nu sunt adsorbite de bilele magnetice și sunt trecute la următorul pas de spălare. Acizii nucleici sunt puri atunci când sunt eluați de pe bilele în prezența unei sări cu concentrație joasă, la căldură. Extractorul automat MagNAPure LC DNA utilizează un kit special de extracție. Kitul conține buffere de spălare, soluții de liză, protein kinaza, suspensii de particule magnetice, buffere de eluție

Procesul tehnologic în extracția automată a acizilor nucleici

În timpul primului pas, reactivii sunt transportați din recipientele respective în cartridge-urile de procesare.

În următorul pas peste probele de lucru din sample cartridge se adaugă soluția de liză după care probele lizate sunt transferate în cartridge-urile de procesare.

În conformitate cu măsurile de reacție definite de protocolul de purificare selectat, amestecul de reacție este transportat la rândurile următoare la godeurile care conțin reactivii utilizați ulterior.

Complexul de particule magnetice și acizi nucleici este legat separat din soluție prin aplicarea magnetului. Proteinele și alte componente contaminante sunt spălate folosind tamponi diferiți de spălare.

Complexul de particule magnetice și acizi nucleici este transportat de la cartridge-urile de procesare la cartridge-urile de eluție unde se va adăuga buffer-ul de eluție. Acizii nucleici sunt eliberați de pe particulele magnetice în condițiile aplicării de căldură și low salt.

În ultima etapă, acizii nucleici sunt transferați din cartridge-urile de eluție în cele de stocare.

Evaluarea modificărilor survenite la nivelul ADN genomic si extragenomic

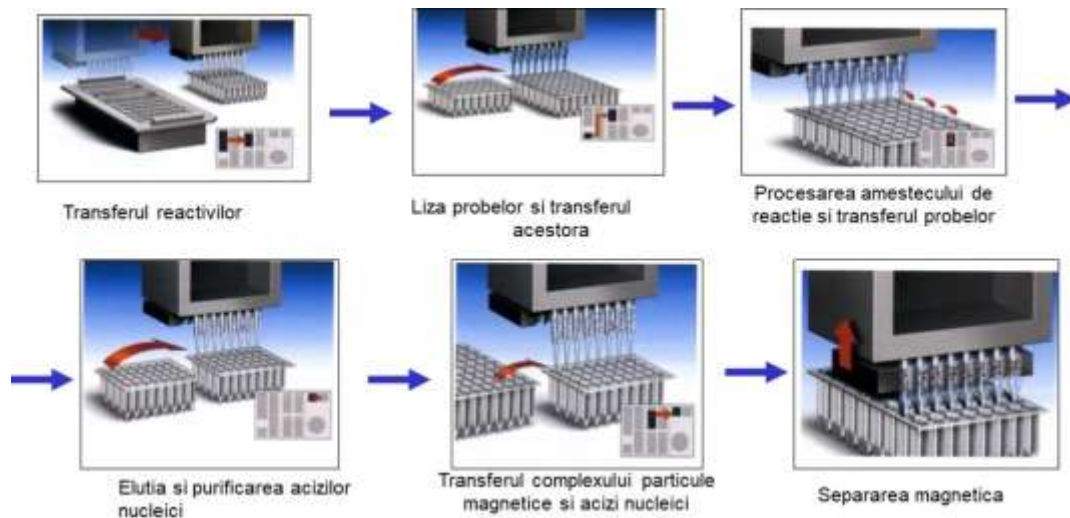


Fig. 3 Etapele de lucru cu extractorul automat de ADN

În timpul procedurii izolarea ADN-ului parcurge urmatoarele etape :

- **Etapa A:** 200ul de suspensie celulară concentrată sunt pipetați în godeurile de la sample cartridge;
- **Etapa B:** celulele sunt lizate în urma adăugării soluției de liza și ADN-ul este eliberat. Proteinele sunt denaturate;
- **Etapa C:** Prin adăugarea proteinei K se începe digestia proteinelor celulare.
- **Etapa D:** Acizii dezoxiribonucleici se leagă de suprafața bilulelor magnetice adăugate în prezența unui buffer de legare;
- **Etapa E:** Bilulele magnetice și acizii nucleici legați sunt separați magnetic din amestecul rezidual de celule lizate;
- **Etapa F:** Complexul bilute magnetice și acizi nucleici este supus unor spălări repetate cu buffere de spălare pentru a elimina substanțe ca: nucleaze, membrane celulare, inhibitori de PCR ca heparina sau hemoglobina;
- **Etapa G:** Bilulele magnetice cu acizii nucleici legați sunt separați magnetic din buffer-ul de spălare care conține debriuri reziduale;
- **Etapa H:** ADN-ul purificat este eluat la 70°C în godeurile de elutie (Figura 4).

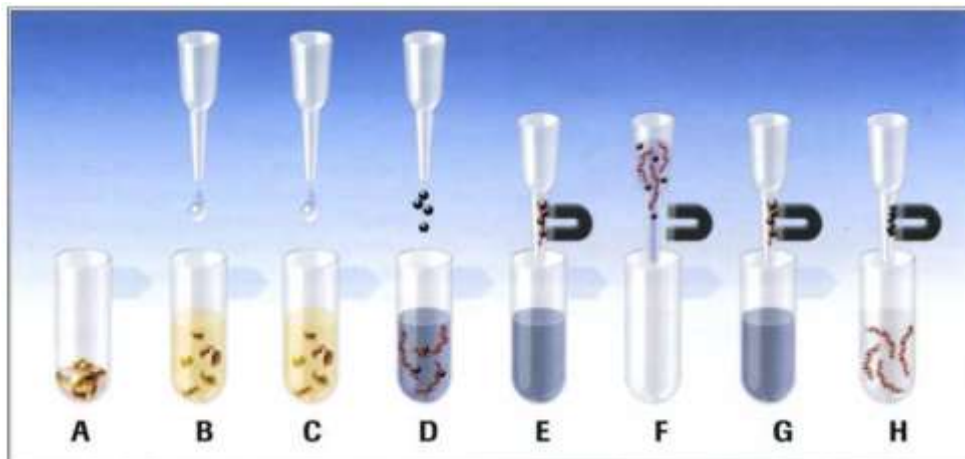


Fig. 4 Etapele procedurii de izolare ADN

Dupa purificarea completa, rezultatele extractiei apar automat. Pagina cu „result screen” arata lista de lucru si protocolul ales. Aceste rezultate pot fi printate sau salvate. In plus, rezultatul cu statusul acceptat sau respins (status „pass” sau „fail”) apare pentru fiecare proba in parte, ceea ce inseamna fie ca probele au fost corect purificate si se poate trece la urmatoarea etapa, fie ca pe parcursul procesului de purificare au avut loc unele erori, caz in care se repeta extractia.

2.3. Analiza comparativă a rezultatelor – cuantificarea ADN

Pentru probele de ADN izolate prin metode chimico-enzimatice, cuantificarea ADN-ului a fost realizata cu ajutorul fluorometrului Qubit3 (In vitrogen, Figura 5)



Fig. 5. Fluorimetru Qubit 3 pentru cantitatie ADN – imagine generica

Procedura implica prepararea solutiei de lucru uzitând 1 μ L reactiv Qubit și 199 μ L buffer Qubit pentru fiecare probă, a cărei cantitate poate varia între 1-20 μ L. Este necesară obținerea unei cantități totale de 200 μ L (soluție de lucru și probă) care va fi analizată prin fluorimetrie. În prealabil, este necesară vortexarea probelor, 2-3 secunde și incubarea acestora la temperatura camerei, 2 minute.

Evaluarea modificărilor survenite la nivelul ADN genomic si extragenomic

Rezultatele probelor analizate sunt redate in tabelul 1. Se poate observa ca pentru majoritatea probelor concentratia ADN izolat este intre 5 si 25 ng/ml, concentratie care poate sa fie suficienta pentru determinarile PCR ulterioare. Singura problema ar putea sa o puna utilizarea in reactia PCR multiplex unde din cauza concentratiei mici volumul necesar de proba ar putea sa depasesca pe cel specificat in conditiile de reactie.

Tabel 1. Cantitatie ADN cu fluorimetrul Qubit 3

Probă	Material biologic	Concentrația probei
E. Coli CP7921	urina	6,6 ng/μL
E. Coli CO1165	urina	11,9 ng/μL
E. Coli CU0181	Aspirat br.	4,76 ng/μL
E. Coli CT6950	Aspirat br.	23,2 ng/μL
E. Coli DK1034	sange	10 ng/μL
E. Coli CT8272	sange	6,36 ng/μL
E.Coli CP9286	sperma	16,8 ng/μL
E.Coli CO1453	Secretie plaga	18,6 ng/μL
S.aureus CL9002	Secretie plaga	23,2 ng/μL
S.aureus CN4099	Secretie plaga	6,16 ng/μL
S.aureus CN3606	Secretie plaga	12,7 ng/μL
S.aureus CN 4099	Secretie plaga	9,96 ng/μL
S.aureus CP8150	Secretie plaga	10,3 ng/μL
S.aureus CP7107	Secretie plaga	3,84 ng/μL
S.aureus CO1438	Secretie plaga	34 ng/μL
S.aureus CN7897	LCR	6,92 ng/μL

Pentru probele de ADN izolate cu extractorul automat de acizi nucleici, am folosit metoda spectrofotometrica, cu ajutorul spectrofotometrului de acizi nucleici Nanodrop ND 100 (ThermoScientific, Figura 6), care calculeaza concentratia AND pe baza masurarii raportului de absorbanta la 260 respectiv 280 nm. Aparatul prezinta avantajul utilizarii unei cantitati minime de produs, 2 microlitrii, ceea ce permite repetarea masuraorilor si economisirea produsului izolat.



Fig. 6. Spectrofotometru Nanodrop ND 100, imagine generica

Evaluarea modificărilor survenite la nivelul ADN genomic si extragenomic

Rezultatele extractiei la unele dintre probe au fost:

Proba E. Coli CP7921 a avut o concentratie de ADN de 53,6 ng/ μ L, raportul 260/280 fiind de 1,86 (Figura 7).

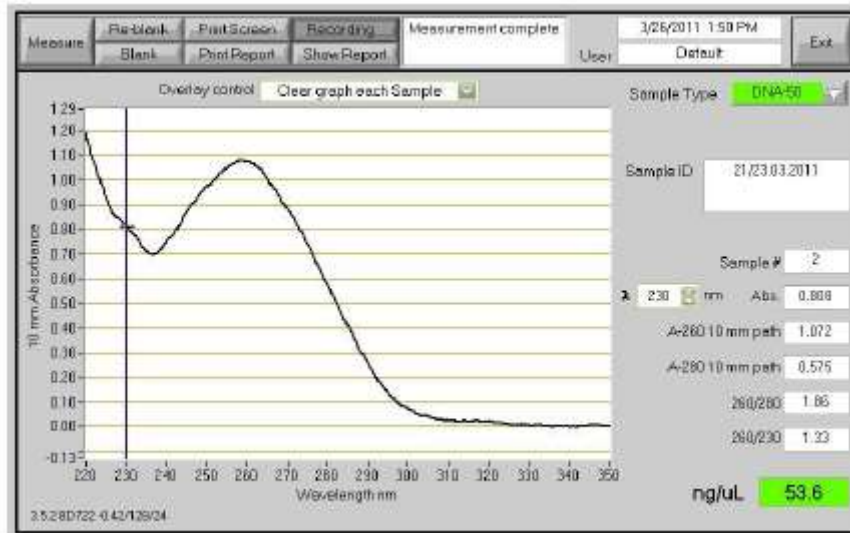


Figura 7

Proba E. Coli CU0181 a avut o concentratie de 46,2 ng/ μ L ADN, raport 260/280 fiind de 1,91 (Figura 8).

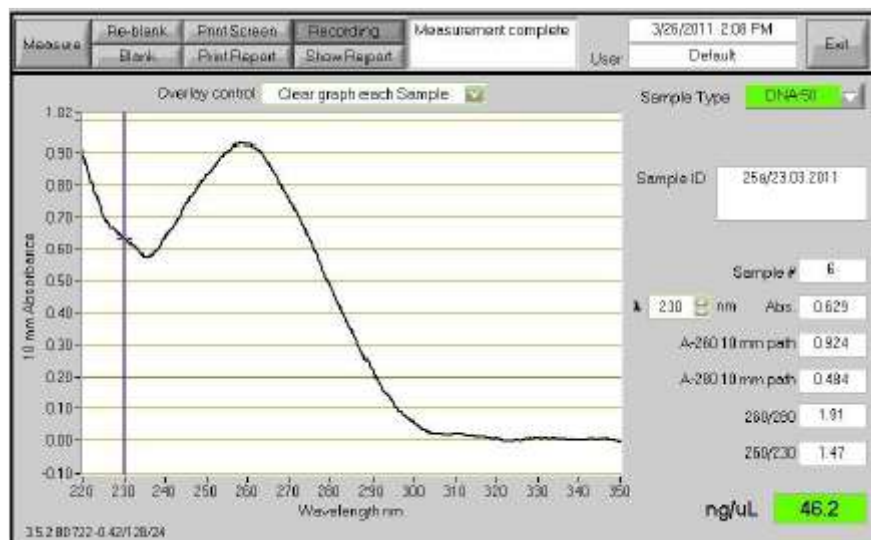


Figura 8

Evaluarea modificărilor survenite la nivelul ADN genomic si extragenomic

Proba E. Coli CT8272 a avut o concentratie de ADN de 119,3 ng/ μ L iar raportul 260/282 este de 1,85 (Figura 9).

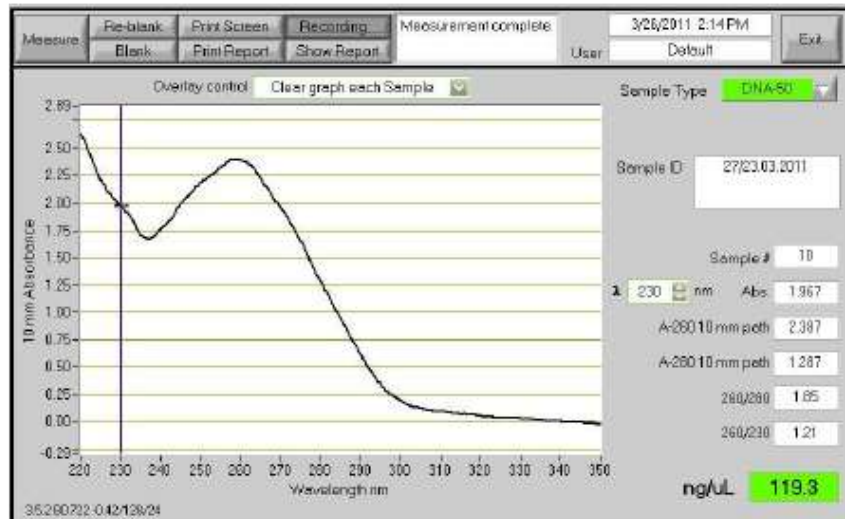


Figura 9

Proba E.Coli C01453 a avut o concentratie de ADN de 85,2 ng/ μ L, raportul 260/280 fiind de 1,89 (Figura 10).

Proba S.aureus CN4099 a avut o concentratie de ADN de 69,2 ng/ μ L si raportul 260/280 de 1,74 (Figura 11).

Proba S.aureus CN3606 a avut o concentratie de ADN de 123,6 ng/ μ L iar raportul 260/280 a fost de 1,58 (Figura 12).

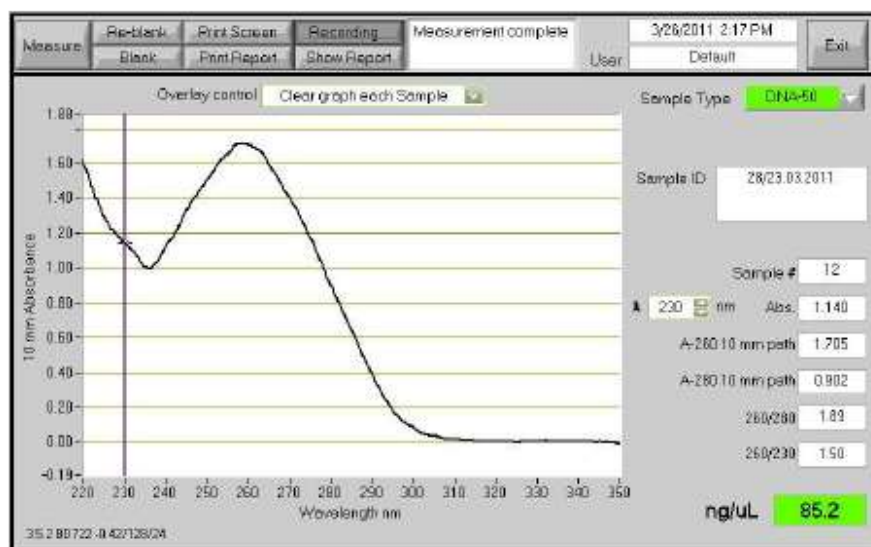


Figura 10

Evaluarea modificărilor survenite la nivelul ADN genomic si extragenomic

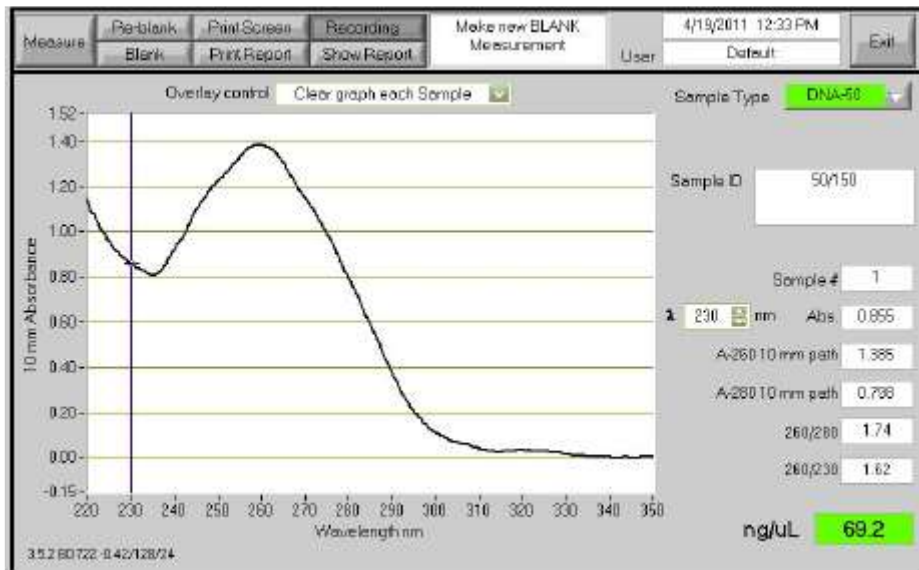


Figura 11

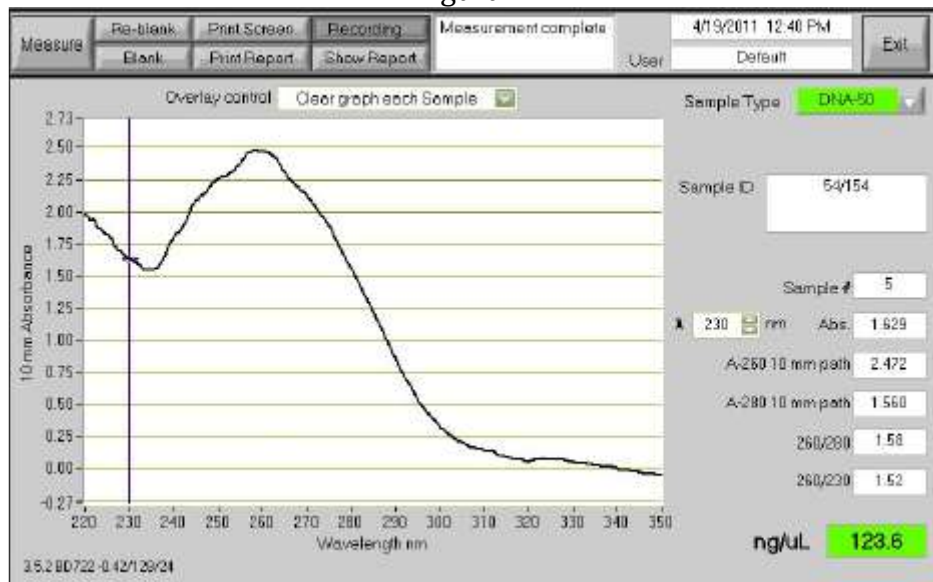


Figura 12

Proba S.aureus CP7107 a avut o concentratie de ADN de 90,5 ng/ μ L cu un raport 260/280 de 1,93 (Figura 13).

Proba S.aureus C01438 a avut o concentratie de ADN de 59,5 ng/ μ L cu un raport 260/280 de 1,98 (Figura 14).

Evaluarea modificărilor survenite la nivelul ADN genomic si extragenomic

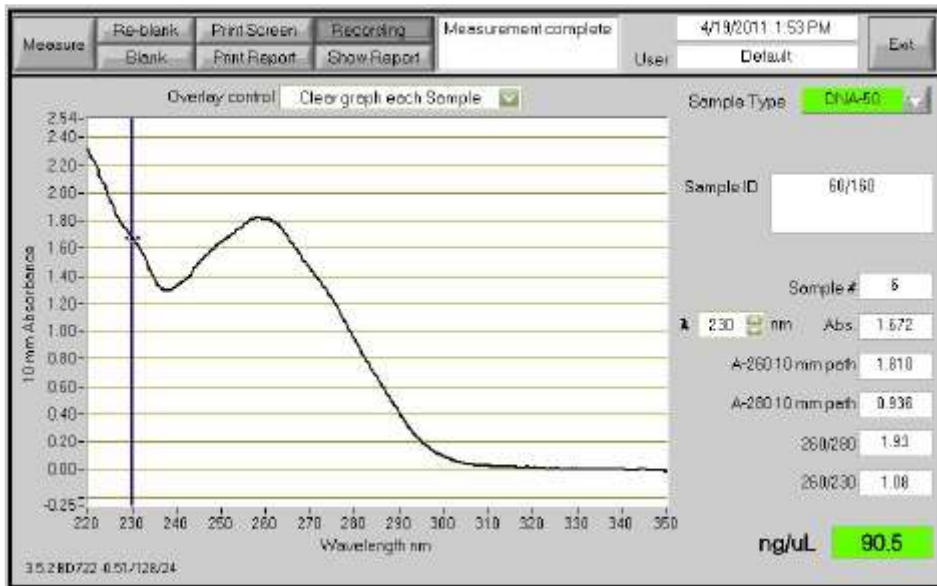


Figura 13

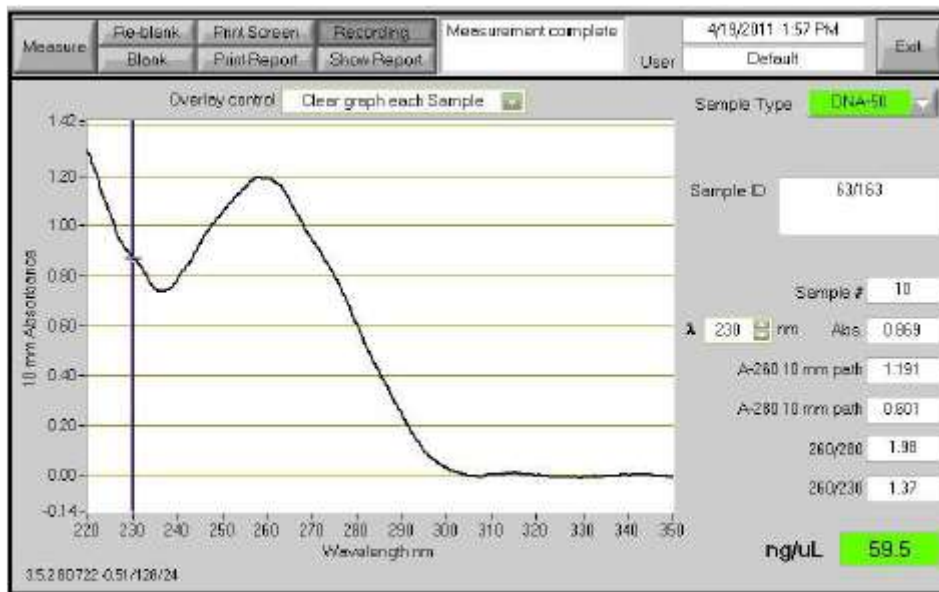


Figura 14

S-a efectuat si o analiza comparativa a concentratiei de ADN extras de la cateva probe E. Coli si probe de S.aureus, pe care am redat-o in figura de mai jos (Figura 15).

Evaluarea modificărilor survenite la nivelul ADN genomic si extragenomic

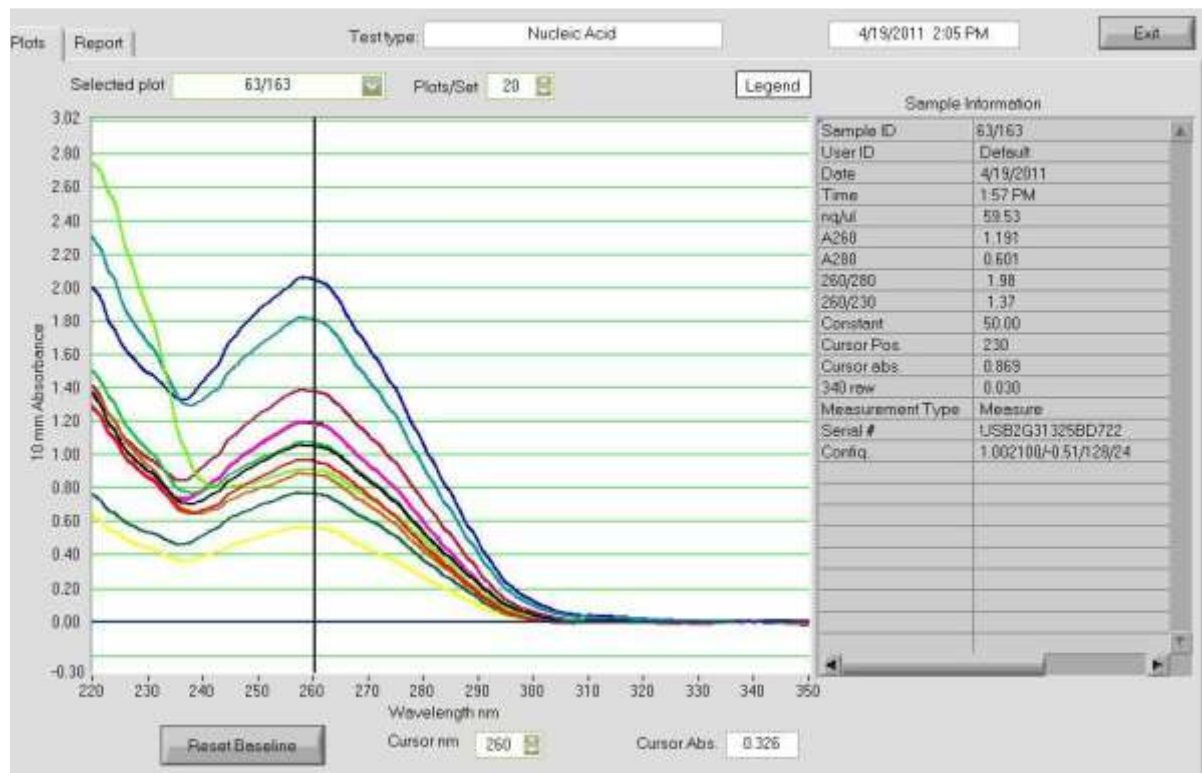


Figura 15. Analiza comparativa a ADN E.Coli, respectiv S.aureus

Concentratia de ADN de la grupul E. Coli si grupul S. aureus a fost determinata tot la Spectrofotometrul ND 100. Din datele prezentate se poate observa ca s-a obtinut ADN cu o concentratie de aproximativ 50ng/μl atat la grupul E. Coli cat si la S.aureus iar raportul de absorbtie A260/A280 care indica puritatea probei este situat intre 1,85 – 1,98. Un raport de aproximativ 1.8 este acceptat ca si pur. In cazul în care raportul este considerabil mai scazut acesta indica prezenta unor proteine, fenol sau alte tipuri de impuritati care absorb puternic in jurul lungimii de unda de aproximativ 280nm.

3. Discutii. Genele de rezistentă si alte modificari la nivel ADN

Recent, Nukui și colaboratorii au realizat analiza întregului genom pentru clonele E. Coli EC129 respectiv ST167. Genele de rezistență prezente în genomul *Escherichie coli* EC129 sunt enumerate în tabelul 1. Au fost identificate următoarele gene: gene de rezistență la aminoglicozide aph (4) -Ia, aph (3 ') - Ia și rmtB, la β-lactam blaCTX-M-14, blaNDM-5, blaOXA-10; la colistină mcr-1; la fluorochinolonă aac (6') - Ib-cr; la fosfomicină fosA3; la macrolidă, lincosamidă și streptogramină B mph (A); gena de rezistență la rifampicină ARR-6; gena de rezistență la sulfonamide sul1 și sul2; tetraciclină rezistența genei tet (A); iar gena de rezistență a trimetoprimului dfrA14 și dfrA27. Mai mult, gena de rezistență la colistină mcr-1 și gena β-lactamază extinsă (ESBL) gena blaCTX-M-14 au fost localizate pe aceeași plasmidă Inc HI2 tip 211.718-bp, în timp ce blaNDM-5 a fost prezent într-o plasmidă de 28,649 bp cu repliconii IncR și IncX3.

Tabel 2: Gene de Rezistență la *Escherichia coli* EC129 (Nukui et.al, 2019)

Gene de Rezistență	Plasmidă	Poziția în plasmidă	Fenotipul
<i>aph(4)-Ia</i>	pEC219_1	127333..128358	Rezistență la aminoglicozide
<i>aph(3')-Ia</i>	pEC219_1	157157..157972	Rezistență la aminoglicozide
<i>blaCTX-M-14</i>	pEC219_1	124332..125207	Rezistență la Beta-lactamază
<i>blaNDM-5</i>	pEC219_5	14927..15739	Rezistență la Beta-lactamază
<i>blaOXA-10</i>	pEC219_3	22052..22852	Rezistență la Beta-lactamază
<i>mcr-1</i>	pEC219_1	61486..63111	Rezistență la Colistină
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	pEC219_2	4663..5262	Rezistență la Fluorochinolonă
<i>fosA3</i>	pEC219_1	123304..123720	Rezistență la Fosfomicină
<i>mph(A)</i>	pEC219_1	155275..156180	Rezistență la Macrolide
<i>ARR-6</i>	pEC219_1	147683..148135	Rezistență la Rifampicină
<i>ARR-6</i>	pEC219_3	19755..20207	Rezistență la Rifampicină
<i>sul2</i>	pEC219_1	133205..134020	Rezistență la Sulfonamide
<i>sul1</i>	pEC219_1	150225..151064	Rezistență la Sulfonamide
<i>sul2</i>	pEC219_2	22617..23432	Rezistență la Sulfonamide
<i>sul1</i>	pEC219_2	7298..8137	Rezistență la Sulfonamide
<i>tet(A)</i>	pEC219_3	14630..15829	Rezistență la Tetraciclină
<i>tet(A)</i>	pEC219_2	33633..34832	Rezistență la Tetraciclină
<i>dfrA27</i>	pEC219_1	148268..148741	Rezistență la Trimetoprim
<i>dfrA14</i>	pEC219_3	23735..24208	Rezistență la Trimetoprim
<i>dfrA14</i>	pEC219_2	29314..29787	Rezistență la Trimetoprim

Tabel 3. Mecanismele și genele de rezistență care sunt asociate cu rezistența la diferite medicamente antimicrobiene (Reygaert, 2016; Miernyk et al., 2011).

Agenți antimicrobieni	Mecanisme de Rezistență	Gene de rezistență
β-lactam Penicilină Cefalosporină Monobactam Carbapena	β-lactamază: inactivare antibiotică eflux activ	<i>ampC</i> <i>bla</i> genes—plasmidă (TEM, SHV, CTX-M, NDM) <i>acrAB(tolC)</i> , <i>acrAD(tolC)</i>
Aminoglicozida Amikacina Gentamicina Tobramacina	enzime modificatoare de aminoglicozide modificare moleculă țintă: 16S rRNA eflux activ	<i>aac</i> , <i>ant</i> , <i>aph</i> —plasmida <i>amrA</i> , <i>rmtB</i> <i>mdtEF(tolC)</i>
Tetraciclina	eflux activ captare limitantă	<i>ompF</i> <i>acrAB(tolC)</i> <i>tetA</i> , <i>tetB</i> —plasmida
Cloramfenicol	eflux activ captare limitantă	<i>ompF</i> <i>acrAB(tolC)</i>
Fluorochinolonă Ciprofloxacină Norfloxacină	captare limitantă modificare moleculă țintă: giraze modificare moleculă țintă: topoizomeraza IV eflux activ	<i>ompF</i> <i>gyrA</i> <i>parC</i> <i>acrAB(tolC)</i> , <i>acrEF(tolC)</i> , <i>mdtABC(tolC)</i>
Cale metabolică inhibitori Trimetoprim	modificarea enzimei țintă	TMP— <i>dhfr</i> SXT— <i>dhps</i>

În ciuda utilizării azitromicinei în unele țări pentru tratarea infecțiilor cauzate de agenți patogeni Gram-negativi, nu există un punct de rezistență pentru *Escherichia coli*. Scopul cercetărilor realizate de către Gomes și colab. (2019) a fost de a analiza nivelurile și

Evaluarea modificărilor survenite la nivelul ADN genomic și extragenomic

mecanismele de rezistență la azitromicină în *E. coli* din probe de scaun obținute de la copii cu și fără diaree. Folosind tehnica PCR prezența celor 10 MRG stabilite, genele *erm* (A), *erm* (B), *erm* (C), *ere* (A), *mph* (A), *mph* (B), *msr* (A), *msr* (D), *mef* (A) și *mef* (B), a fost confirmată în toate tulpinile izolate. În toate cazurile au fost utilizate controale negative și pozitive (microorganisme care transportă MRG-urile incluse în studiu) pentru a valida rezultatele. În plus, probe pozitive selectate la întâmplare au fost secvențiate. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 4, comparativ cu alte studii.

Tabel 4. Secvența primerilor pentru identificarea unor gene de rezistență în *E. Coli*

Țintă		Primeri		Mărime (bp)	(°C)	Ref.
Gena	Proteina	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')			
Gene de rezistență la macrolide						
<i>ere</i> (A)	EreA	GCCGGTGCTCATGAACTTGAG	CGACTCTATTCGATCAGAGGC	420	60	Palma și colab., 2017
<i>erm</i> (A)	ErmA	TCTAAAAAGCATGTAAAAGAAA	CGATACTTTTTGTAGTCTTC	533	52	
<i>erm</i> (B)	ErmB	GAAAAAGTACTCAACCAAATA	AGTAACGGTACTTAAATT	639	45	
<i>erm</i> (C)	ErmC	TCAAACATAATATAGATAAA	GCTAATATTGTTAAATCGTCAAT	642	45	
<i>mef</i> (A)	MefA	AGTATCATAATCACTAGTGC	TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG	345	54	
<i>mef</i> (B)	MefB	ATGAACAGAATAAAAAATTG	AAATTATCATCAACCCGGTC	1255	45	
<i>mph</i> (A)	MphA	GTGAGGAGGAGCTTCGCGAG	TGCCCGAGGACTCGGAGGTC	403	60	
<i>mph</i> (B)	MphB	ATTAAACAAGTAATCGAGATAGC	TTTGCCATCTGCTCATATTCC	868	50	
<i>msr</i> (A)	MsrA	GCACTTATTGGGGTAATGG	GTCTATAAGTGCTCTATCGTG	384	58	
<i>msr</i> (D)	MsrD	CCCCAGTTGGACGAAGTAA	TTGTTTTCCGATTCCATTAC	781	50	
Ținte cromozomiale de rezistență la macrolide						
<i>rplD</i>	L4	GGCAAGAAAATGGCAGGTCAGATG	TTCCATCGCAGTAGACGCTTTTTCA	845	56	Gomez și colab., 2013
<i>rplV</i>	L22	CGGTGGAAAGCGGAGACAAGAAG	ACCAGTTTTGCGTCCAGTTCAGGCT	925	56	
<i>rplHa</i>	—	TAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCG	TGATGCGTCCACTCCGGTC	756	61	
Altele						
<i>rep^b</i>	—	GCGCCGICATGCGGCATT	—	MB	40	Gomez și colab., 2013
<i>uidA</i>	—	CATTACGGCAAAGTGTGGTCAAT	CCATCAGCACGTTATCGAATCCTT	658	55	Walk și colab., 2009

- ^a codifică ARN 23S;

- ^b primer conceput pentru a amplifica spațiul dintre secvențele palindromice repetitive extragenice (REP).z

Mendes și colab. (2019) au utilizat 2751 de tulpini *E. coli* izolate de la pacienții internați în Statele Unite ale Americii în timpul Programului de Monitorizare Antimicrobian SENTRY din anul 2016. Rezultate obținute de către aceștia au arătat că majoritatea tulpinilor de *E. coli* (88,2%) responsabile pentru infecția tractului urinar sau a fluxului sanguin care îndeplinesc criteriile de screening bazate pe MIC au purtat gene codificatoare ESBL (99,3% CTX-M, 0,3% din SVH-12, și 0,3% din TEM-19), urmate de izolate asociate cu AmpC (9,2%), fie purtând AmpC plasmidică (81,3% de CMY-2, 3,1% de CMY-42, sau 3,1% din DHA-1) sau care prezintă supraexpresia AmpC cromozomială (12,5%). Un total de 2,0% de *E. coli* nu au

Evaluarea modificărilor survenite la nivelul ADN genomic si extragenomic

prezentat niciuna dintre genele β -lactamazei cercetate și au fost atribuite aici ca fiind necunoscute. Două tulpini izolate de *E. coli* (0,6%) au purtat fiecare genele de codificare a carbapenemazelor Klebsiella KPC-2 și KPC-3. În plus, printre izolatele *E. coli* care poartă variante de blaCTX-M, grupul CTX-M 1 (60,5% în total sau 69,3% în gene CTX-M) și grupul 9 (26,9% în total sau 30,7% în cadrul genelor CTX-M) au predominat.

Figura 16 prezintă distribuția generală a genelor care codifică β -lactamază detectate în *Escherichia coli* responsabile de infecțiile tractului urinar sau infecțiile fluxului sanguin.

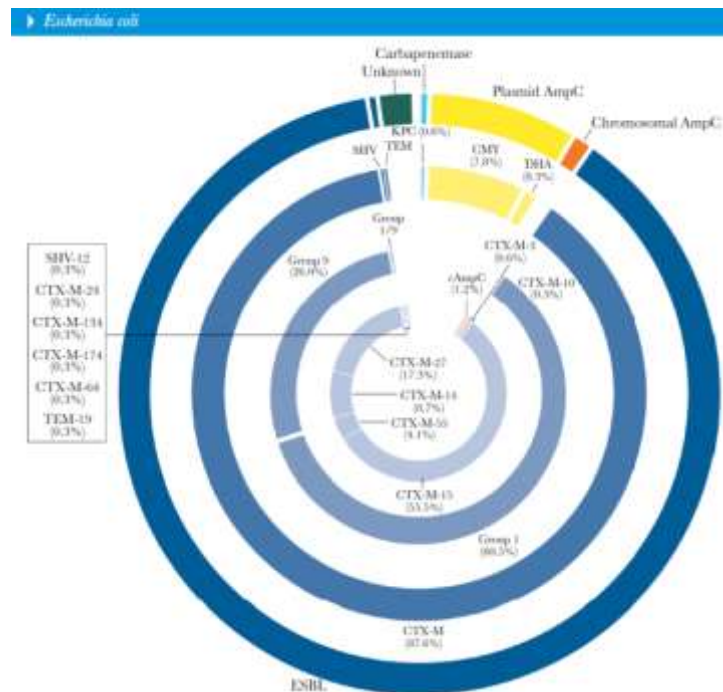


FIG. 16 Distribuția generală a genelor care codifică β -lactamază detectate în *Escherichia coli* cauzând infecții ale tractului urinar sau infecții ale fluxului sanguin (Mendes et. al. 2019)

Bibliografie

1. Banerjee R., Strahilevitz J., Johnson J. R. et al., "Predictors and molecular epidemiology of community-onset extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* infection in a Midwestern Community," *Infection Control and Hospital Epidemiology*, vol. 34, no. 9, pp. 947–953, 2013;
2. Blair Jessica M. A. Webber Mark A., Baylay Alison J., Ogbolu David O., Piddock Laura J. V., Molecular mechanisms of antibiotic resistance, www.nature.com/reviews/micro, vol 13;
3. Blake, K. L. & O'Neill, A. J. Transposon library screening for identification of genetic loci participating in intrinsic susceptibility and acquired resistance to anti staphylococcal agents. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 12–16 (2013);
4. Campbell SJ, Deshmukh HS, Nelson CL, et al. Genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from a multinational trial of complicated skin and skin structure infections. *J Clin Microbiol* 2008; 46:678–84;
5. Carattoli A., "Plasmids and the spread of resistance," *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 303, no.6-7, pp. 298–304, 2013;
6. Chambers HF. Methicillin-resistant staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 1988;1:173-86;
7. Deshpande LM, Rhomberg PR, Sader HS, Jones RN. Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of *Enterobacteriaceae* isolated in the United States medical centers: report from the MYSTIC Program (1999- 2005). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 56:367–72;
8. Düzgün Azer Özad, Okumuş Funda, Saral Ayşegül, Çiçek Ayşegül Çopur, Sedanur Cinemre, Determination of antibiotic resistance genes and virulence factors in *Escherichia coli* isolated from Turkish patients with urinary tract infection, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine*, 2019 Vol.:52;
9. Feng J, Qiu Y, Yin Z, et al. Coexistence of a novel KPC-2- encoding MDR plasmid and an NDM-1-encoding pNDMHN380- like plasmid in a clinical isolate of *Citrobacter freundii*. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:2987-91;
10. Fisher JF, Mobashery S. beta-lactam resistance mechanisms: gram-positive bacteria and *Mycobacterium tuberculosis*. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016;6:a025221;
11. Gibreel T. M., Dodgson A. R., Cheesbrough J., Fox A. J., Bolton F. J., Upton M., "Population structure, virulence potential and antibiotic susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* from Northwest England," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 67, no. 2, Article ID dkr451, pp. 346–356, 2012;
12. Giesbrecht P, Kersten T, Maidhof H et al. Staphylococcal cellwall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiol Mol Biol R* 1998;62:1371–414;
13. Gomes Cláudia, Ruiz-Roldán Lidia, Mateu Judit, Ochoa J. Theresa, Ruiz Joaquim, Azithromycin resistance levels and mechanisms in *Escherichia coli*, www.nature.com/scientificreports, 2019, Volume 9, p. 1-10;
14. Harris PNA, Tambyah PA, Lye DC, et al; MERINO Trial Investigators and the Australasian Society for Infectious Disease Clinical Research Network (ASIDCRN). Effect of piperacillin-tazobactam vs meropenem on 30-day mortality for patients with *E coli* or *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection and ceftriaxone resistance: a randomized clinical trial. *JAMA* 2018; 320:984–94;

15. Hornsey M, Phee L, Wareham DW. A novel variant, NDM-5, of the New Delhi metallo-beta-lactamase in a multidrug-resistant *Escherichia coli* ST648 isolate recovered from a patient in the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;
16. Jensen SO, Lyon BR. Genetics of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol* 2009;4:565–82.
17. Levy SB, McMurry L. Detection of an inducible membrane protein associated with R-factor-mediated tetracycline resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 1974;56:1060-8;
18. Lewis JS 2nd, Herrera M, Wickes B, et al. First report of the emergence of CTX-M-type extended-spectrum betalactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a U.S. health care system. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:4015-21;
19. Lim D, Strynadka NC. Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Struct Biol* 2002;9:870–6.
20. Limbago B, Fosheim GE, Schoonover V, et al; Active Bacterial Core surveillance MRSA Investigators. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected in 2005 and 2006 from patients with invasive disease: a population-based analysis. *J Clin Microbiol* 2009; 47:1344–51;
21. Liu, A. *et al.* Antibiotic sensitivity profiles determined with an *Escherichia coli* gene knockout collection: generating an antibiotic bar code. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 1393–1403 (2010);
22. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:165-74;
23. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 2003;111:1265–73;
24. Marshall SA, Wilke WW, Pfaller MA, Jones RN. *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility, and molecular (*mecA*) characterization of oxacillin resistance in the SCOPE program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 30:205–14;
25. McMurry L, Petrucci RE, Levy SB. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:3974-7;
26. Miernyk K, Debyle C, Harker-Jones M, et al. Serotyping of *Streptococcus pneumoniae* isolates from nasopharyngeal samples: use of an algorithm combining microbiologic, serologic, and sequential multiplex PCR techniques. *J Clin Microbiol* 2011; 49:3209–14;
27. Mendes RE, Bell JM, Turnidge JD, et al. Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp. in Asia- Pacific nations: report from the SENTRY surveillance program. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63:55–9;
28. Mendes RE, Castanheira M, Woosley LN, et al. Molecular β -lactamase characterization of Gram-negative pathogens recovered from patients enrolled in the ceftazidime-avibactam phase 3 trials (RECAPTURE 1 and 2) for complicated urinary tract infections: efficacies analysed against susceptible and resistant subsets. *Int J Antimicrob Agents* 2018; 52:287–92;
29. Mendes RE, Castanheira M, Woosley LN, et al. Molecular β -lactamase characterization of aerobic gram-negative pathogens recovered from patients enrolled in the ceftazidime-avibactam phase 3 trials for complicated intra-

- abdominal infections, with efficacies analyzed against susceptible and resistant subsets. *Antimicrob Agents Chemother* **2017**; 61;
30. Mendes RE, Castanheira M, Gasink L, et al. β -Lactamase characterization of gram-negative pathogens recovered from patients enrolled in the phase 2 trials for ceftazidime-avibactam: clinical efficacies analyzed against subsets of molecularly characterized isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 60:1328–35;
 31. Mendes RE, Sader HS, Deshpande LM, et al. Characterization of baseline methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates recovered from phase IV clinical trial for linezolid. *J Clin Microbiol* 2010; 48:568–74;
 32. Mendes RE, Deshpande LM, Smyth DS, et al. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains recovered from a phase IV clinical trial for linezolid versus vancomycin for treatment of nosocomial pneumonia. *J Clin Microbiol* **2012**; 50:3694–702;
 33. Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, et al. Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *J Clin Microbiol* 2007; 45:544–7;
 34. Mendes Rodrigo E., Jones Ronald N., Woosley Leah N., Cattoir Vincent, Castanheira Mariana, Application of Next-Generation Sequencing for Characterization of Surveillance and Clinical Trial Isolates: Analysis of the Distribution of β -lactamase Resistance Genes and Lineage Background in the United States., *Open Forum Infectious Diseases* 2019;6(S1):S69–78;
 35. Miriagou V, Tzelepi E, Gianneli D, et al. *Escherichia coli* with a self-transferable, multiresistant plasmid coding for metallo-beta-lactamase VIM-1. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:395-7;
 36. Massova I, Mobashery S. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrob Agents Ch* 1998;42:1–17.
 37. Nelson GE, Pondo T, Toews KA, et al. Epidemiology of invasive group A streptococcal infections in the United States, 2005-2012. *Clin Infect Dis* 2016; 63:478–86;
 38. Nielsen JB, Caulfield MP, Lampen JO. Lipoprotein nature of *Bacillus licheniformis* membrane penicillinase. *P Natl Acad Sci USA* 1981; 78:3511–5.
 39. Nordmann P, Boulanger AE, Poirel L. NDM-4 metallo- β -lactamase with increased carbapenemase activity from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:2184-6;
 40. Nukui Yoko, Ayibieke Alafate, Tanaguchi Makoto, Aiso Yoshiyumi, Shibuya Yuka, Kazunari Sonobe, Nakajima Jun, Kanehira Saki, Hadano Yoshiro, Tohda Shuji, Koike Ryuji, Saito Ryoichi, 2019, Whole-genome analysis of EC129, an NDM-5-CTX-M-14-, OXA-10- and MCR-1-co-producing *Escherichia coli* ST167 strain isolated from Japan, *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, Volume 18, p. 148-150;
 41. Ode T, Saito R, Kumita W, et al. Analysis of plasmid mediated multidrug resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca* isolates from clinical specimens in Japan. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34:347-50;
 42. Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, et al. Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3554-60;
 43. Peacock SJ, Paterson GK. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Biochem* 2015;84:577–601;

Evaluarea modificărilor survenite la nivelul ADN genomic și extragenomic

44. Pfaller MA, Acar J, Jones RN, et al. Integration of molecular characterization of microorganisms in a global antimicrobial resistance surveillance program. *Clin Infect Dis* 2001; 32(Suppl 2):S156–67;
45. Reygaert C. Wanda, Antimicrobial Mechanisms of *Escherichia coli*, *Adv Clin Med Microbiol.* 2016;2:1-11. <http://dx.doi.org/10.5772/67363>;
46. Rhoads DD. Commentary: lowering the barriers to routine whole genome sequencing of bacteria in the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2018; 56:e00813–18;
47. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis* 2006;6:629-40;
48. Scoulica EV, Neonakis IK, Gikas AI, et al. Spread of blaVIM-1-producing *E. coli* in a university hospital in Greece. Genetic analysis of the integron carrying the blaVIM-1 metallo-beta-lactamase gene. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;48:167-72;
49. Sockett D.C., Valley Ann, Antimicrobial susceptibility testing, Wisconsin Veterinary Diagnostic Laboratory, 2006, April 14;
50. Utsui Y, Yokota T. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Ch* 1985;28:397–403;
51. Tatiana Vassu, Ileana Stoica, Ortansa Csutak, F. Mușat, 2001, *Genetica microorganismelor și inginerie genetică microbiană, note de curs și tehnici de laborator*, Editura Petrion, București.
52. Walsh CT, Wencewicz TA. *Antibiotics: Challenges, Mechanisms, Opportunities*. Washington, DC: ASM Press, 2016;
53. Wu S, Piscitelli C, de Lencastre H, et al. Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of mecA from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*. *Microb Drug Resist* 1996;2:435-41.